

## **ПРИМЕНЕНИЕ ЩЕЛОЧНОГО ГЕЛЬ-ЭЛЕКТРОФОРЕЗА ИЗОЛИРОВАННЫХ КЛЕТОК В ЭМБРИОНАЛЬНЫХ ТКАНЯХ МЫШЕЙ**

*Пашинская Е.С., Зорина В.В., Бекиш В.Я., Побяржин В.В.*

*УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов  
медицинский университет»*

Наиболее перспективным и чувствительным методом обнаружения первичных повреждений молекулы ДНК изолированных клеток при воздействии факторов окружающей среды считается гель-электрофорез изолированных клеток - "Comet assay" или метод "ДНК-комет" [1]. Метод предложили О. Osting и K.J. Johanson, а его детальная разработка была завершена N.P. Singh et al. в 1988 г и P.L. Olive et al. в 1990 г. После лизиса и электрофореза заключенных в агарозный слой эукариотических клеток поврежденная ДНК мигрирует в электрическом поле по направлению к аноду, образуя структуру, похожую на комету, в которой выделяется "голова" и "хвост". Интерпретация результатов основана на гипотезе, что вызванные генотоксическими факторами повреждения ДНК ядра состоят из низкомолекулярных участков, разрывов, репарационно-вырезанных повреждений и щелочно-лабильных участков ДНК. В результате лизиса освобожденные из ядра клеток поврежденные участки ДНК при электрофорезе формируют "хвост кометы", а неповрежденные – "голову кометы". Изображения комет на микропрепаратах вводятся в ПЭВМ и оцифровываются. Учет повреждений молекулы ДНК проводится путем анализа цифровых изображений автоматическими программами. Это облегчает оценку полученных результатов. С каждого микропрепарата в среднем подсчитывается по 100 клеток, в каждой из которых учитывается длина "хвоста кометы" в пикселях, а также процент ДНК в "хвосте". В качестве основного международно-принятого показателя генотоксического воздействия факторов среды используется "момент хвоста", вычисленный из длины "хвоста", умноженный на процент ДНК в "хвосте" [1].

Метод "ДНК-комет" имеет широкие возможности оценки повреждений, вызываемых генотоксическими факторами в соматических тканях, поскольку может проводиться в гомогенизированных тканях желудка, кишечника, печени, почек, легких, селезенки, мочевого пузыря, костного мозга. Гель-электрофорез единичных клеток в генеративных клетках применяется сравнительно недавно на сперматозоидах млекопитающих и человека,

а также на ооцитах человека. После обработки сперматозоидов протеиназой К применяются щелочная и нейтральная версии метода, которые позволяют определить уровни щелочно-лабильных сайтов, одноцепочечных и двухцепочечных разрывов ДНК соответственно [1]. Однако метод практически не применяется в эмбриональных клетках.

**Цель исследования** – адаптировать метод щелочного гель-электрофореза изолированных клеток для эмбриональных тканей мышей.

**Материалы и методы.** Исследование проведено на 24 белых беспородных мышах (20 самок и 4 самца). Животных рассаживали в 4 стандартные пластмассовые клетки с железной решеткой по 5 самок и 1 самцу в каждой. Скрещивание животных проводили в течение 24 часов. Животные содержались на стандартном рационе в сухом помещении с искусственным освещением. Наступление беременности у самок определяли по гиперемии наружных половых органов и наличию сперматозоидов в мазке из влагалища.

*Получение клеточных суспензий эмбриональных клеток мышей.* На 14-й день беременности мышей-самок умерщвляли путем декапитации и выделяли матки, которые помещали в чашки Петри с 7 мл среды RPMI-1640. Под бинокулярной лупе при увеличении в 16х выделяли эмбрионы и удаляли с них амниотическую оболочку. От каждой самки брали по 4 жизнеспособных, подвижных эмбрионов, которые отмывали изогнутой препаровальной иглой в фарфоровой ступке с 5 мл среды RPMI-1640. После удаления раствора эмбрионы измельчали глазными ножницами в фарфоровой ступке, далее пестиком в 3 мл среды RPMI-1640 и переносили в центрифужные пробирки на 10 мл. Пробирки выдерживали 5 мин при комнатной температуре для осаждения крупных фрагментов семенных канальцев, после чего верхний слой жидкости переносили во вторую пробирку. Суспензии эмбриональных клеток трижды отмывали в 7 мл среды RPMI-1640 путем 10 минутного центрифугирования при 1100 об/мин и температуре 8°C. После второй отмывки в пробирке оставляли 1 мл клеточной суспензии, который тщательно перемешивали. Для разведения 30 мкл клеточной суспензии переносили в третью пробирку и добавляли 200 мкл средой RPMI-1640 и использовали в качестве негативного контроля. Для позитивного контроля к 30 мкл клеточной суспензии добавляли 200 мкл среды RPMI-1640 и инкубировали 5 мин при температуре 37°C со 100 мкМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Щелочной гель-электрофорез изолированных эмбриональных клеток проводили по N.P. Singh et al. [3] в нашей модификации [2].

Учет повреждений молекулы ДНК проводили путем анализа цифровых изображений с помощью автоматической программы "CASP v. 1.2.2". В микропрепарате подсчитывалось по 100 клеток, в каждой из которых учитывали "момент хвоста". В 100 случайно выбранных клетках определяли процент апоптотических. Статистическая обработка полученных цифровых данных производилась на ПЭВМ с использованием программы Excel 2003. Просчитывались средняя арифметическая, и ее стандартное отклонение ( $M \pm SD$ ). Достоверность выявляемых различий определяли по t-критерию Стьюдента. Полученные результаты считались достоверными при  $P < 0,01 - 0,05$ .

**Результаты и обсуждение.** При проведении щелочного гелелектрофореза изолированных эмбриональных клеток на 14 день беременности в негативном контроле процент поврежденной ДНК составил  $4,64 \pm 0,98$ , а длина хвоста "комет" –  $21,27 \pm 4,74$  пикселей. "Момент хвост" в негативном контроле составил  $1,83 \pm 0,38$ , а процент апоптотических клеток  $2,60 \pm 0,89$ .

В позитивном контроле процент поврежденной ДНК составил  $10,48 \pm 2,72$ , что было достоверно больше в 2,3 раза, чем в контрольном показателе. Длина хвостов комет ( $144,00 \pm 8,63$  пикселей) была в 6,9 раз больше по сравнению с показателем негативного контроля ( $P < 0,02$ ). "Момент хвост" в позитивном контроле составил  $5,49 \pm 1,60$ , что в 3 раза достоверно было больше показателя негативного контроля. Процент апоптотических клеток составил  $6,80 \pm 1,30$  и в 3,7 раз превышал уровень негативного контроля.

Таким образом, при применении щелочной версии гелелектрофореза изолированных клеток получены четкие, достоверные отличия всех основных показателей метода негативного от позитивного контроля. Модифицированная нами версия метода ДНК-комет для эмбриональных клеток может успешно применяться для оценки эмбриотоксических биологических факторов окружающей среды.

Литература:

1. Бекиш, В. Я. Состояние генома хозяина при гельминтозах / В. Я. Бекиш, О. -Я.Л. Бекиш. – Витебск: Изд-во ВГМУ, 2004. – 218 с.
2. Дурнев, А. Д. Применение метода щелочного гелелектрофореза изолированных клеток для оценки генотоксических свойств природных и синтетических соединений: методические рекомендации, утв. РАМН и РАСН / А. Д. Дурнев [и др.]. – М., 2006. – 27 с.
3. A Simple Technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells/ N. Singh [et al.] // Exp. Cell Research. – 1988. – Vol. 175. – P.184–191.